



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 農藥生化感測器之研發與應用

5中9

### Development of Pesticide Biosensors and it's Application

計畫編號：NSC 88-2113-M-032-001

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：林孟山 淡江大學 化學系

#### 一、中英文摘要

苯胺和其他芳香環胺類在工業上是很重要的原料，這些化合物通常被使用於農藥、染料及聚合物的製程上。苯胺是一種疑似致癌物，並且會對環境造成污染。其氧化峰電位在+760mV，但是在利用電化學方法直接偵測苯胺時，由於電極表面的聚合反應；阻礙了電子傳導，所以會使偵測的訊號越來越小，導致偵測再現性變差。本研究為利用流注分析系統，配合碳墨的使用將 phenothiazine 修飾在電化學偵測器上，可以有效地將苯胺的偵測電位由+760mV 降至+300mV，也可以避免聚合反應所造成的影響，增加偵測再現性。結果顯示連續 20 次測定 10 $\mu$ M 苯胺的氧化訊號，相對標準偏差為 2.6%，偵測極限為 0.1 $\mu$ M(S/N=3)，線性達 20 $\mu$ M(相關係數 R=0.9997)。

關鍵詞：農藥、感測器、苯胺、催化劑、啡

#### Abstract

Aniline and its derivatives are very important compounds in industrial application. Usually these compounds be used to produce dyestuff, polymers and pesticides etc. These derivatives have been suspected as a carcinogen among the environment pollutant. Aniline can be oxidized on +760 mV (Ag/AgCl). However, the direct oxidation of aniline can be troublesome as the polymerization effect on electrode surface when use electrochemical method. Because the polymerization obstructs electron transfer to electrode surface, thus, signal will decrease and cause poor reproducibility. A phenothiazine modified carbon ink electrode was used to detect aniline. The modified electrode can avoid polymerization effect and apply good reproducibility. At the measurement of 10 $\mu$ M aniline, the relative standard deviation is 2.6%(n=20). The estimated detection limit (S/N=3) is 0.1 $\mu$ M and the linearity of response is up to 20 $\mu$ M (with correlation coefficient R=0.9997)

Keywords: pesticide; sensor; aniline; catalyst; phenothiazine

#### 二、計畫緣由與目的

由近年來行政院農委會、衛生署及消基會等組織所公佈農產品農藥殘留的檢測結果，均可發現有相當比例的農藥殘留，其中更不乏有殘留量遠超過安全容許劑量數十倍者，甚至有高含量不得檢出農藥之禁藥殘留。由這些檢測結果發現農藥濫用已達明顯危害國人健康的程度。因此簡易之農藥偵測儀器如生化感測器，將能提供消費者在採購農作物時作即時的分析測定，如此消費者方能有效保障自身食的安全。故本計畫希望能透過電化學式感測器的發展，建立起偵測農藥的模式，進而能發展成手提式小型偵測儀器，以便利大眾的需求，使農藥的檢測更加廣泛，避免農藥濫用所造成的危害，以保障國人的健康。

#### 2-1 苯胺的應用範圍及毒性

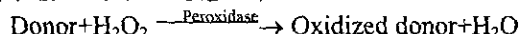
苯胺目前廣為應用於各種工業製程如農藥合成、木材著色劑的製造，染料的合成、顏料，印刷油墨的製造，醫藥的合成，橡膠防老劑的製造等等<sup>(1)</sup>。根據記錄在 1996 年美國苯胺的年使用量為 681 萬公噸，而且每年也持續著 6% 的成長<sup>(2-3)</sup>。在台灣從民國 83-86 年間台灣地區總共輸入了約 3 萬公噸的苯胺<sup>(4)</sup>。可知苯胺被大量使用其殘留將可能對人體及生態造成嚴重的影響。此外部分農藥反應或分解後的產物即為苯胺或其衍生物，因此發展便捷且靈敏地偵測方法將是有其必要地。美國環境保護署將苯胺歸類為第三級毒性化合物，它在生物體內會代謝成其他有害副產物如對-胺基酚<sup>(5)</sup>。在針對人體地研究中顯示苯胺會引起突變<sup>(6-8)</sup>。此外苯胺的反應性強，滲透到地下水中後與其他化合物反應亦會生成有害的產物而對環境造成污染。

#### 2-2 苯胺偵測

由於苯胺具有光學活性及 UV 吸收峰，所以在檢測苯胺時層析法<sup>(9)</sup>及光譜法<sup>(10-11)</sup>是最先被應用在苯胺的分析上。如 M. A. Fox 等<sup>(12)</sup>利用 HPLC 和光電化學偵測器將經由分離出的樣品流經 Pt 和 TiO<sub>2</sub> 的雙電極系統，經由定電位儀測得電流變化量以偵測訊號，此系統能完全分離苯胺和其他物質，但其中並未使用到任何電解質所以分析物吸收 TiO<sub>2</sub> 所產生的電子不平均時，訊號即會受到相當大的影響，不適合發展成實用的技術。

G. M. Smol'skii 等<sup>(13)</sup>則利用萃取和光譜的方法來縮短偵測的時間。波長固定在 500nm，操作之重現性 R.S.D 為 4.2~10%，雖然能改善分析時間過久的問題，但處理步驟複雜重複操作時 R.S.D 相差大，因此並不適用在一般的環境分析。

不管是使用層析方法或使用光譜方法在操作上、或者是儀器的設備上都較電化學的偵測方法麻煩且價格昂貴。基於這樣的理由乃發展以電化學方式偵測。但是直接偵測苯胺的氧化時會遇到苯胺電聚合的反應，而阻礙質傳及電子的傳導，造成再現性變差，所以進而發展出利用 horseradish peroxidase (HRP) 來偵測苯胺<sup>(14)</sup>的方法反應如下：

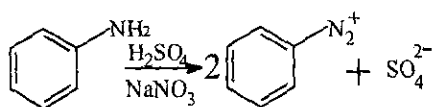


苯胺分子可當作上述反應中電子的提供者，在經由酵素反應後會被氧化而使系統偵測到訊號。

P. Dominguez-Sanchez 等<sup>(15)</sup>利用 HRP 製成的碳糊電極覆蓋 Nafion 膜，於自動流注分析系統(FIA)，電位 +100mV (vs. Ag/AgCl) 電解質中含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，對苯胺偵測極限為  $1.2 \times 10^{-6}$  M (S/N=3)。連續注入 8 次  $5 \times 10^{-6}$  M 的苯胺之 R.S.D 為 0.75%，此方法解決層析法耗時問題，但是由於雙氧水在放置後就會還原成水，導致酵素作用時濃度無法恆定影響實驗準確性。

所以，Annika Lindgren 等人<sup>(16)</sup>便利用 glucose oxidase (GOx)、mutarotase 及 HRP 三種酵素的結合來偵測芳香環胺類，利用 GOx 在水溶液中和葡萄糖反應後所產生的雙氧水和 HRP 作用。偵測電位 -50mV (vs. Ag/AgCl)，偵測極限 10μM。此系統成功的解決了雙氧水會還原成水而造成實驗誤差的問題。

但是，只要有電子提供者的存在電子便會轉移給 HRP 而產生催化的作用，所以此種偵測方法選擇性不高，幾乎所有的芳香環胺類都可以偵測到而有嚴重的干擾問題。且酵素保存不易費用也較昂貴。所以 J. A. Rodrigue 和 A. A. Barros<sup>(17)</sup>就成功的達成了不利用酵素而偵測苯胺的目的。在 pH 2.5 苯胺中加入硝酸鈉與苯胺溶液反應使苯胺重氮化反應如下：



再利用 1-naftol 與重氮化的苯胺產生鍵結，然後將 pH 值調到 9 配合剝除法來偵測苯胺，使用懸汞電極，吸附電位和時間為 +400mV (vs. Ag/AgCl) 2 分鐘，偵測電位 +200mV，對於苯胺的偵測極限為 0.8μg/l。

雖然，J. A. Rodrigue 和 A. A. Barros 利用此系統時可以做到不需酵素的優點，但其處理樣品步驟繁複，且汞電極易造成環境二度污染。因此本計畫欲藉由修飾能降低苯胺偵測電位的催化劑於電極上以降低偵測電位、不使用酵素、能在接近中性條件下操作並減少偵測時間等優點。但是若經由在解決此問題，

### 三、研究方法

#### 3-1 藥品

純水(Milli-Q Reagent Water System0)。0.1μM Aluminum oxide powder(Baikalox)。苯胺(Sigma)。Imidazol、Sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate、Sodium hydroxide、Cyclohexanone、potassium hexacyanoferrate (III) 購自 Riedel-deHaën。Phenothiazine 購自 Aldrich。Hepes 和 Tris(tris(hydroxymethyl aminomethane))購自 Mallinckrodt。

#### 3-2 儀器

HPLC、Electrochemical Detector (GBC)、參考電極 Ag/AgCl、工作電極 3mm 玻璃碳 Wall-jet 電極。Sample loop(Cotati)。BAS100B。超音波震盪器 (CREST)。吸量管 100μl (Eppendrop) 和 10μl (Jencons)。pH meter(Suntex)，Balance (Mettler AE200)。

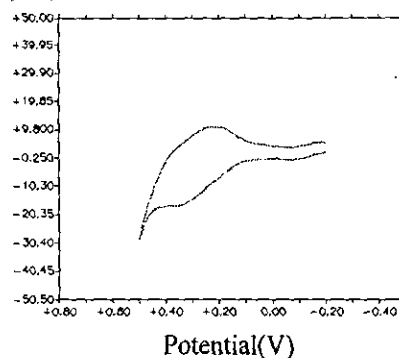
#### 3-3 電極製備

將玻璃碳電極以鋁粉拋光，放入超音波清洗槽中震盪洗淨。然後將 phenothiazine 和碳墨混合均勻後以 cyclohexanone 稀釋。直接取上述混合液滴於倒置的玻璃碳電極上，以烘箱乾燥 60 分鐘備用。

### 四、結果與討論

#### 4-1 phenothiazine 對於苯胺偵測機制的探討

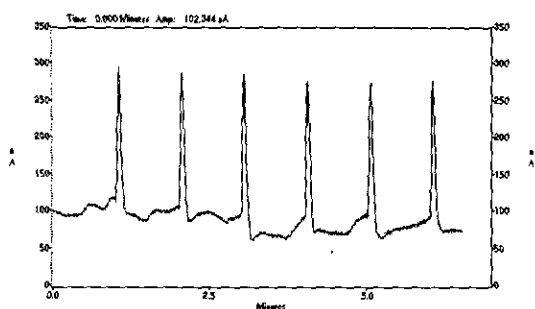
本研究係利用電化學的方法偵測苯胺。使用 phenothiazine 修飾電極來偵測苯胺。其循環伏安圖如 (圖一) 所示，



(圖一) Phenothiazine 修飾之玻璃碳電極，在電解液為 0.05M pH 8 的磷酸緩衝溶液中之循環伏安圖，電位掃描從 -0.2 至 +0.5V，掃描速率為 50mV/s

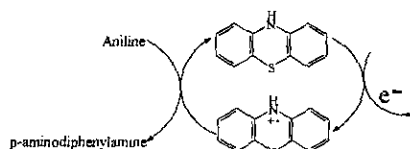
當掃描速率固定於 50mV/s，電位從 -0.2V~1.2V (vs. Ag/AgCl) 在 pH 8 的磷酸緩衝溶液下，發現苯胺具有一氧化峰其氧化電位為 +0.76V。但若將偵測電位放於苯胺的氧化電位時。由於此偵測電位太高，所以並不適合於電化學分析上。

當使用修飾 30% (w/w) phenothiazine 的修飾碳墨電極，於 FIA 系統下在施加電位為 +300mV (vs Ag/AgCl)，使用 pH 8 的磷酸緩衝溶液時，注射 50μM 的苯胺結果如 (圖二) 所示，



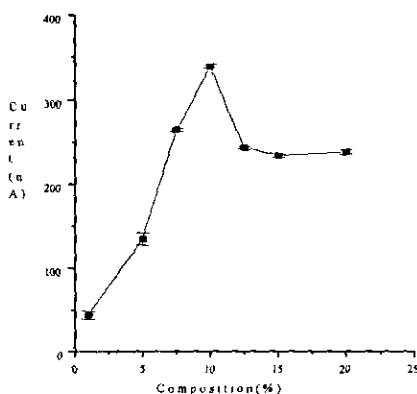
(圖二) 修飾 Phenothiazine 30% 的碳電極之 FIA 電流響應圖操作電位 +300mV 下偵測對 50 $\mu$ M 苯胺的電流訊號，電解液為 0.05M、pH 8 之 phosphate buffer、流速為 1ml/min、注入分析物的體積為 50 $\mu$ l

在未修飾的電極上苯胺的氧化電位為 +760mV，但是使用 phenothiazine 修飾電極苯胺的氧化電位可降低到 +300mV 就開始進行電子轉移反應，經由供給一個氧化的電位將 phenothiazine 氧化後，就可測到其氧化電流。電子轉移機制推測如下：



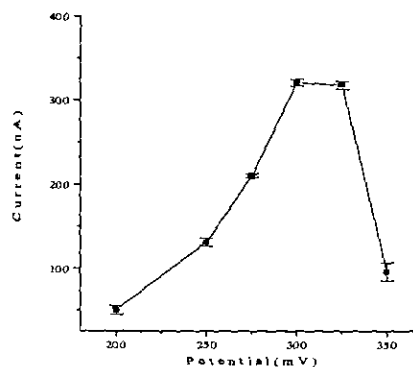
### 3-2 分析最佳化的探討

修飾在電極表面上催化物數量的多寡會影響整個系統偵測的靈敏度，和背景電流大小，本實驗探討不同重量百分比的 phenothiazine 固定在玻璃碳電極表面，偵測所得的催化電流和改變 phenothiazine 組成的關係（圖三），由圖中可以看出隨著 phenothiazine 組成的增加，所測得的苯胺催化電流也增加。但重量百分比超過 10% 之後電極導電度下降，使電流開始下降。因此本實驗選擇 phenothiazine 重量百分比為 10% 來作為電極製備的條件。



(圖三) Phenothiazine 組成的探討，將不同重量百分比的 phenothiazine 修飾在玻璃碳電極上，偵測 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號，其餘條件同（圖二）

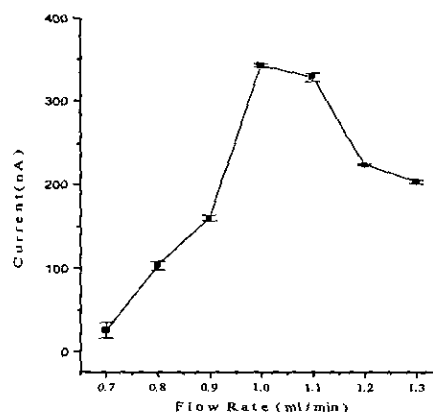
電位的選擇關係到系統偵測時的靈敏度，同時也關係著苯胺本身的氧化及電聚合反應發生的程度。偵測電位的探討如（圖四）



(圖四) 偵測電位的探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，修飾比例固定在 10%(w/w)，在不同偵測電位下對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號，其餘操作條件同圖三

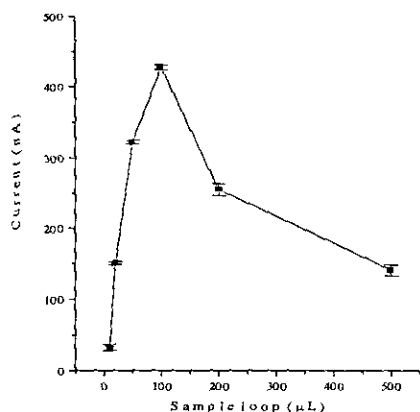
當電位由 +200mV 開始往上升時隨著電位的增加，雖然在電位較低時苯胺也會產生氧化聚合的情形，但是由於苯胺氧化聚合的數量不多，苯胺和 phenothiazine 之間電子的轉移還不會受到任何阻礙，所以訊號就隨著電位的增加而增加。但是當電位超過 +300mV 時，苯胺聚合的能力也相對增加，此時苯胺所形成聚合物就會影響到苯胺和 phenothiazine 之間電子的傳遞，使得偵測電流下降。

在 FIA 系統中流體的流速會影響到分析物通過電極表面的時間，此時間太長容易造成半峰寬變寬而影響所得訊號的解析度。而流速也是電極表面苯胺聚合反應後的產物能否被流體帶走的關鍵。實驗探討流速對於催化電流的影響。由圖五可以發現流速在 1ml/min 的對於苯胺的偵測有最大的催化電流。



圖五 流體流速的探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極在不同的流體流速下對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號其餘操作條件同圖四

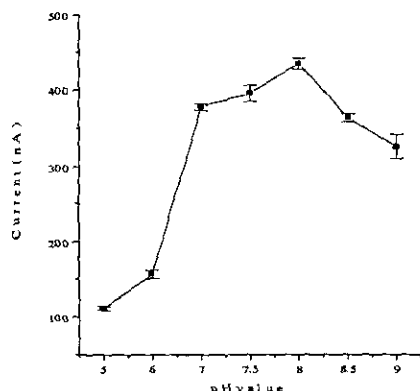
本實驗同時也探討了注入體積對於偵測訊號的影響。在 FIA 的系統中分析物注入的體積影響通過電極表面時間上的差異，所以影響偵測訊號的大小及苯胺在電極表面聚合的程度。由（圖六）可以發現注入體積在 100 $\mu$ L 時有最大的電流。



（圖六）注入分析物體積的探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，載送流速為 1ml/min 於不同注入體積中對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號，其餘條件同圖五。

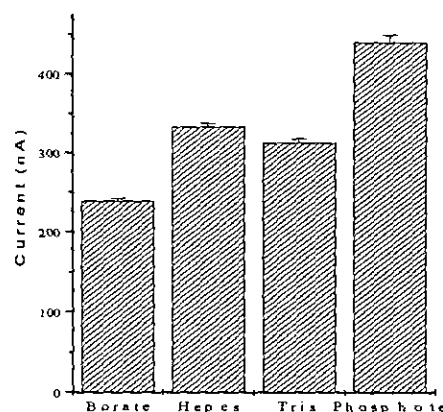
在注入小體積時，苯胺在極短時間內便已通過電極，此時分析物尚無法完全擴散至電極表面與其反應即被載送流體帶走，所以訊號較小。相對的若分析物有較長的時間可以擴散至電極表面則訊號將變大，但是當注入體積大於 100 $\mu$ L 之後，分析物經過電極的時間太長，此時苯胺會在電極表面進行明顯的聚合反應導致電子傳導受阻造成訊號變小。

由於苯胺的氧化物會隨著 pH 值的不同而不同，而且溶液的酸鹼性，也會影響 phenothiazine 在光解後的穩定性，因此有必要針對溶液酸鹼值與偵測訊號所產生的影響做一個探討。於（圖七）的實驗結果中可發現，在 pH 8 時，可以有最大的偵測訊號。



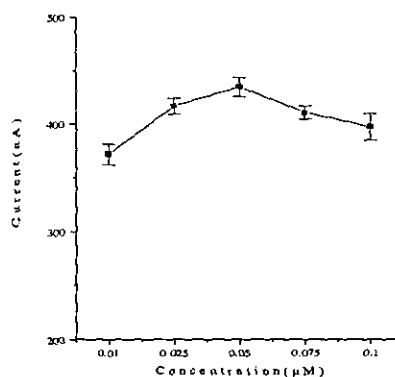
（圖七）溶液 pH 值探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，於不同 pH 之緩衝溶液中對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號，分析物注入體積為 100 $\mu$ L 其餘條件同圖六。

由於電解質的種類會影響系統偵測時的靈敏度，因此為了使系統在整個偵測過程中，為了能有更好的靈敏度，研究選擇在 pH 8 時之四種電解質來進行條件最佳化的探討。由（圖八）的結果中可發現四種溶液中以 phosphate buffer 的靈敏度最好，故選擇 phosphate buffer 作為偵測時的電解質溶液。



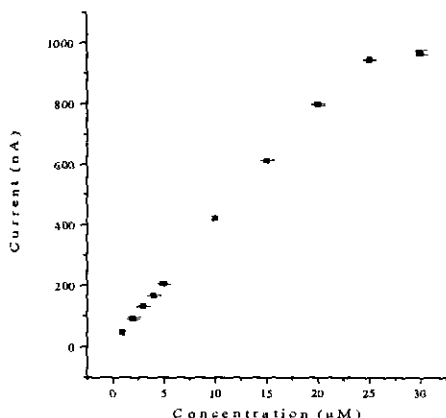
（圖八）電解質的探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，於 pH 8 之各種緩衝溶液中對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號其餘條件同圖七。

本研究也探討了在 pH 8 的磷酸緩衝溶液對於五種不同濃度進行條件最佳化的探討 0.025M、0.05M、0.075M、0.1M 和 0.2M 對於 10 $\mu$ M 苯胺的催化電流訊號。由圖十二實驗的結果中可發現五種濃度對偵測訊號的影響。可以發現在 0.05M 的磷酸緩衝溶液中有最大的催化電流，因此選擇 0.05M 的磷酸緩衝溶液作為最後分析特性的探討。



（圖九）電解質濃度的探討，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，於不同濃度的磷酸緩衝溶液中對於 10 $\mu$ M 苯胺的電流訊號其餘條件同圖七。

使用 phenothiazine 偵測苯胺，在 0.05M pH 8 的磷酸緩衝溶液中流體流速為 1ml/min，電位 +300mV (vs. Ag/AgCl) 注入體積為 100 $\mu$ L，連續打入 20 次的 10 $\mu$ M 苯胺，其相對標準偏差為 2.6%。線性為 1-20 $\mu$ M ( $r=0.999$ )（圖九），偵測極限 0.5 $\mu$ M ( $S/N=3$ )。



(圖九) 苯胺偵測校正曲線，以 phenothiazine 修飾的玻璃碳電極，對苯胺的偵測訊號，其餘條件同圖二

由於環境中有許多干擾存在，所以本研究選擇了 SDS (界面活性劑)、humic acid (腐植酸) 及 camphor (樟腦) 來探討干擾物對於系統的影響，其中 SDS 為在各種清潔用品中常用之化合物，雖然其沒有電活性但由於分子較大會影響電極表面質傳而影響偵測訊號。humic acid 則是存在於環境中的易氧化物質，而 camphor 也是存在於自然界中的大分子，同樣也會阻礙質傳。在流體流速固定於 1ml/min，電位固定在 +300mV (vs. Ag/AgCl)，注入體積為 100μl，在 pH 8 0.05M 的磷酸緩衝溶液對於含 4 ppm SDS、humic acid 及 camphor 的 10μM 之苯胺的催化電流訊號。發現在含 SDS 及 humic acid 的苯胺溶液中，偵測所得訊號比上單純苯胺溶液的訊號比為 1:1.41 及 1:1.42，在易氧化化合物的實驗中含 4ppm 的 humic acid 的苯胺溶液訊號比上單純苯胺溶液的訊號比為 0.99:1。

#### 四、結論

本研究利用 phenothiazine 的修飾電極在 FIA 系統上配合電化學的方法可在 +300mV (vs. Ag/AgCl) 直接偵測苯胺，成功的將直接偵測苯胺所需的電位降低了 460mV，並且可以在接近中性的溶液酸鹼值下偵測，而成功的改善了重複操作時苯胺毒化電極的問題，此外使用電化學系統則能達到快速分析的要求。有助於未來將此系統進一步應用於真實樣品的農藥分析。

#### 五、參考文獻

- [1] <http://www.epa.gov/scripts/tornado/marker.exe?S=1&p=%Adf%D3i&i=5124>
- [2] *Chemical Week*, 1996, 158, 29, 16-20
- [3] *Chemical week*, 1997, 159, 6, 33
- [4] <http://www.epa.gov/scripts/tornado/marker.exe?S=1&p=%Adf%D3i&i=5352>
- [5] J. P. Cravedi, C. Gillet, and G. Monod, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1995, 54, 711-716
- [6] F. F. Kadlubar, M. A. Butler, K. R. Kaderlik, H. C. Chou, and N. P. Lang, *Environmental Health Perspectives*, 1992, 98, 69-74
- [7] A. F. Badawi, A. Hirvonen, D. A. Bell, N. P. Lang and F. F. Kadlubar, *Cancer Research*, 1995, 55, 5230-5237
- [8] <http://www.earthsystems.org/gopher/toxics/Aniline>
- [9] S. D. Huang, C. P. Cheng, and Y. H. Sung, *Analytica Chimica Acta*, 1997, 343, 701-708
- [10] G. M. Smol'skii; and T. A. Kuchmenko, *J. Anal. Chem.* 1997, 52, 1, 85-88
- [11] M. J. W. Chang, Y. C. Su and R. S. Lin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 49, 694-700
- [12] M. A. Fox, and T. T. Tien, *Anal. Chem.*, 1988, 60, 2278-2282.
- [13] G. M. Smol'skii; and T. A. Kuchmenko, *J. Anal. Chem.* 1997, 52, 1, 85-88
- [14] T. Ruzgas, J. Emméus, L. Gorton, G. Marko-Varga, *Anal. Chim. Acta.*, 1995, 311, 245-253
- [15] P. Dominguez-Sanchez, C. K. O'Sullivan, A. J. Miranda-Ordieres, *Analytica Chimica Acta*, 1994, 291, 349-356
- [16] F. D. Munteanu, A. Lindgren, J. Emmeus, L. Gorton, T. Ruzgas, E. Csoregi, A. Ciucu, R. B. van Hustee, I. G. Gazayan, and L. M. Ladrimini, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 2596-2600
- [17] J. A. Rodrigues, and A. A. Barros, *Talanta*, 1995, 42, 915-920